感染球孢白僵菌的家蚕免疫应答差异表达基因分析

侯成香[1,2]，覃光星[1,2]，耿　涛[1,2]，高　坤[1,2]，潘中华[1]，钱荷英[1,2]，郭锡杰[1,2,*]
（1. 江苏科技大学蚕业研究所，江苏镇江 212018；2. 中国农业科学院蚕业研究所，江苏镇江 212018）

摘要：【目的】筛选家蚕 *Bombyx mori* 应对白僵菌 *Beauveria bassiana* 侵染的应答基因，以进一步研究家蚕抵御真菌侵染的分子机制。【方法】采用新一代 Solexa 高通量测序技术对感染白僵菌及未感染白僵菌的对照组家蚕进行了测序分析，筛选差异表达基因；结合生物信息学工具分析差异表达基因的功能注释、分类及涉及的信号通路等；应用荧光定量 PCR 技术验证 10 个基因的差异表达。【结果】通过测序和生物信息学分析共获得 377 个差异表达基因，其中表达上调基因 236 个，下调基因 141 个；KEGG 通路分析表明，各通路中既有表达上调的基因，也有下调基因；12 个上调基因、26 个下调基因参与 3 个显著性富集的 KEGG 通路，即核糖体、氨酰 tRNA 生物合成和剪接体通路。定量 PCR 与测序结果显示，溶菌酶、热激蛋白、谷胱甘肽 S-转移酶、肽聚糖识别蛋白等与免疫应激相关的蛋白基因均呈现表达上调。【结论】本研究筛选获得的差异表达基因，特别是上调表达的基因可能与家蚕应对白僵菌侵染的应答机制有关，其中与免疫应激相关的蛋白基因如溶菌酶、热激蛋白、谷胱甘肽 S-转移酶、肽聚糖识别蛋白基因等可能直接参与了家蚕对白僵菌的免疫识别和防御，研究结果为从分子水平阐明家蚕抵御真菌侵染的防御机制和白僵菌对家蚕的致病机理提供新的依据。

关键词：家蚕；球孢白僵菌；免疫应答；转录组；差异表达基因
中图分类号：Q965.8　　**文献标识码：**A　　**文章编号：**0454-6296(2014)01-0013-12

Differentially expressed genes in the silkworm (*Bombyx mori*) against infection by *Beauveria bassiana*

HOU Cheng-Xiang[1,2], QIN Guang-Xing[1,2], GENG Tao[1,2], GAO Kun[1,2], PAN Zhong-Hua[1], QIAN He-Ying[1,2], GUO Xi-Jie[1,2,*] (1. Sericultural Research Institute, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212018, Jiangsu, China; 2. Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhenjiang, Jiangsu 212018, China)

Abstract:【Aim】To screen the responsive genes of the silkworm (*Bombyx mori*) against infection by *Beauveria bassiana* in order to further elaborate its molecular mechanisms of defensing *B. bassiana* infection.【Methods】High throughput Solexa sequencing technology was employed in the transcriptome analysis of silkworm larvae of the infected and uninfected (control) groups. Differentially expressed genes (DEGs) and their functions, classifications and pathways were analyzed by bioinformatics methods. Ten DEGs were further identified by fluorescence quantitative PCR.【Results】With Solexa sequencing and bioinformatic analysis, 377 DEGs including 236 up-regulated genes and 141 down-regulated genes were identified. KEGG pathway analysis indicated that there were both up- and down-regulated DEGs in any pathway. Twelve up-regulated DEGs and 26 down-regulated ones were involved in three significantly enriched KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) pathways, *i. e.*, ribosome, aminoacyl-tRNA biosynthesis and spliceosome pathways. Both the quantitative PCR and Solexa sequencing results indicated that the immune response-related genes including lysozyme, heat shock protein, glutathione S-transferase and peptidoglycan recognition protein genes were all up-regulated.【Conclusion】The differentially expressed genes identified in this study, especially those up-regulated ones, are possibly involved in the silkworm response against *B. bassiana* invasion. The genes related to immune response such as those encoding lysozyme, heat shock protein, glutathione S-transferase and peptidoglycan recognition protein may be directly involved in immune recognition and defense of the silkworm against the *B. bassiana* infection. The results provide a new basis and clues for clarifying the mechanisms of

基金项目：国家自然科学基金项目(31272498)；教育部高等学校博士学科点专项科研基金（20103220110003）
作者简介：侯成香，女，1972 年生，安徽当涂人，博士，副研究员，研究方向为家蚕分子病理学与遗传育种，E-mail：cxhou587@163.com
* 通讯作者 Corresponding author, E-mail: guoxijie@126.com
收稿日期 Received：2013-08-05；接受日期 Accepted：2013-11-25

interaction between the silkworm and entomopathogenic fungi at the molecular level.
Key words: *Bombyx mori*; *Beauveria bassiana*; immune response; transcriptome; differentially expressed gene

家蚕 *Bombyx mori* 既是重要的经济昆虫，也是鳞翅目昆虫的模式生物。真菌病是蚕业生产中的四大传染病之一，白僵菌 *Beauveria bassiana* 既是其中危害最严重的一种真菌，也是农林害虫生物防治中最常用的真菌杀虫剂之一。病原真菌与宿主之间的相互作用是宿主感染病原并激发免疫防御的生物学基础，也是宿主应答基因表达水平变化的起因。白僵菌与马尾松毛虫 *Dendrolimus punctatus*（Lu *et al*., 2008）、亚洲玉米螟 *Ostrinia nubilalis*（陶淑霞等，2011）及桑天牛 *Apriona germari*（王达等，2009）等昆虫间的互作有一定的研究，但与家蚕互作的研究不多，根据相关的研究结果难以建立家蚕抗真菌的免疫应答机制。因此，开展白僵菌与家蚕互作机理的研究，寻找宿主体内与白僵菌感染密切相关的应答基因，探索其作用机理、阐明其表达机制，可为家蚕真菌病的防治以及真菌在生物防治中的应用奠定基础。

白僵菌属半知菌类（fungi imperfecti），其发育周期分为分生孢子、营养菌丝和气生菌丝 3 个阶段。在适宜的温湿度下，附着在昆虫体壁上的分生孢子侵入宿主体腔并伸长转化为能吸收养分、生长繁殖、随体液扩展到全身的营养菌丝，该菌丝还能形成能脱离母菌丝、自行吸收养分、向一端或两端延伸为新营养菌丝的芽生孢子。宿主死亡 1～2 d 后，菌丝穿出体壁形成气生菌丝，该菌丝的分生孢子梗上长有许多极易脱落飞散的分生孢子。

本研究将 Solexa 高通量测序技术运用到感染白僵菌的家蚕转录组分析中，依据家蚕基因组数据库，从功能基因组角度分析家蚕应对白僵菌侵染的重要靶基因，从而为从分子水平上开展家蚕乃至昆虫抵御真菌侵染的防御策略的研究奠定信息基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验所用家蚕品种为本所保存的大造，在正常饲养条件下（25℃，RH 80%～85%）饲养至 3 龄起蚕（二眠后刚恢复进食的 3 龄幼虫）后分为 2 组，每组 60 头用于下列实验。白僵菌 *B. bassiana* 源自本实验室从蚕体上复壮、分离纯化并保存。

1.2 白僵菌的接种和感染

用灭菌水从斜面培养基上洗脱白僵菌分生孢子，并稀释至 4×10^6 孢子/mL。将一组起蚕在该悬浮液中浸泡 10 s 作为感染组，另一组作为对照在灭菌水中处理相同时间；感染组和对照组的家蚕幼虫在眠期已用蚕座消毒粉剂进行体表消毒。感染处理后，两组材料均在 28℃ RH 95% 的高温高湿环境下饲养 8 h，再移至正常温湿度环境中饲养。接种8 h 后，收集感染组和对照组幼虫各 15 头，各平均分 3 管装；迅速投入到液氮中速冻，－80℃保存。其余的蚕继续饲养（正常饲养环境下），观察生长发育及发病情况。

1.3 总 RNA 的提取、纯化与 cDNA 的合成

取 5 头家蚕幼虫，研磨后利用 Trizol 试剂（Invitrogen 公司，美国）提取总 RNA。定量后取 6 μg 总 RNA，用 Illumina Gene Expression Sample Prep Kit（Illumina 公司，美国）中的 Oligo（dT）磁珠纯化 mRNA；定性、定量后用 PrimeScript® 1st Strand cDNA Synthesis Kit（TaKaRa 公司，日本），按照使用说明书操作步骤反转录合成 cDNA。将合成的 cDNA 样品送往深圳华大基因公司构建数字表达谱文库。

1.4 数字基因表达谱（digital gene expression profiling，DGE）文库的构建

利用 Illumina Cluster Station 和 Illumina HiSeq™ 2000 系统对 cDNA 样品进行数字基因表达谱文库的构建工作。实验利用 Illumina HiSeq™ 2000 系统、采用边合成边测序法进行测序。最终每个通道将产生数百万条原始图像数据，这些数据经 base calling 转化为原始序列数据（raw data）。

1.5 原始序列数据分析

去除原始序列数据中 3′接头、低质量及含杂质的成分，得到洁净标签（clean tag）。检索家蚕数据库（ftp://silkdb.org）中 mRNA 上所有的 CATG 位点，生成 CATG＋17nt 碱基的参考标签数据库。所有的 clean tag 与参考标签数据库进行比对（最多允许一个碱基错配），对其中只比对到一个基因的标签进行基因注释；统计每个基因对应的原始 clean tag 数，然后对原始 clean tag 数做标准化处理，获得标准化的基因表达量。

基因注释与其涉及到的途径分析主要参考家蚕数据库(ftp://silkdb.org)和 KEGG 数据库(http://www.genome.jp/kegg/pathway.html)；基因分类根据基因本体论(gene ontology，GO)中细胞成分(cellular component)、分子功能(molecular function)和生物过程(biological process) 3 个亚类进行分析。

1.6　荧光定量 PCR 验证分析

利用 Primer Premier 5.0 软件设计了 10 对荧光定量 PCR 引物，引物序列及相关信息见表 1。挑选的基因中部分可能与昆虫免疫应答相关，如 DG3，DG5，DG7，DG8，DG15 和 DG16，部分基因参与了代谢、物质转运等生理过程，如 DG2，DG7，DG11 和 DG14；而 DG9 则参与了应激反应。

表 1　实时荧光定量 PCR 引物

Table 1　Primers used for real-time quantitative PCR

引物名称 Primer name	基因产物 Gene product	引物序列(5′-3′) Primer sequence
DG2	Hypothetical protein KGM_10198	GTCTGCTACACGCTAAACTGCTCGC TTCCTTTTGGGCTTGTCTGTCTCTG
DG3	Cytochrome P450 CYP4G48	TCAGCGACCACGAAATCAAAGAGG TACCCAACAAACAGAGGACAAAGC
DG5	Glutathione S-transferase omega 1	CGTACCACAAGGCTTTAGATTTC ATCAGCGTATCCAGGTTCACTTC
DG7	Serine protease precursor	TCAGTTCACCCTCGCTTTTGGC TTTTGTTGGTTGTTGGCTCCCG
DG8	Putative lysozyme	GCGTGTGTGTGTTTGTGGACTTGTG TCTTTTATGTCTTCGTTTCGGAGCCG
DG9	Heat shock protein 19.9	AGGCAAACACGAGGAGAAGA TGGGTGCGATTACAGACAAC
DG11	Importin-7	TCAGCAGGGTGTCGAGATG CGAGGGGTGTTGTGTAGCA
DG14	Asparagine synthetase	AAACAAACTGTGATGTCGAAGC CAGAGGTCTAACGCCATAAGGA
DG15	Peptidoglycan recognition protein S6 precursor	AATTCCTTAGGCTGGGGTGA CCGTGGACAGAAGCTTTTTT
DG16	30kP protease A (43k peptide) precursor	AGGATGGGAAGCAGAAGAAG GCGAGTAGCAGTGCAATGAG
	β-actin	AATGGCTCCGGTATGTGC TTGCTCTGTGCCTCGTCT

按照 SYBR Premix Ex Taq^{TM} Kit (TaKaRa 公司，日本) 说明书进行定量 PCR 实验。实验以接种处理后的总 RNA 反转录的 cDNA 为模板，20 μL 反应体系；反应程序为：95℃30 s；95℃5 s，60℃31 s，45 个循环；3 次重复。以家蚕 *β-actin* 基因为内参，用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$法(Livak and Schmittgen，2001)分析家蚕感染白僵菌后感染、对照组中基因相对转录水平的变化。每处理和对照重复 3 次。

1.7　数据统计分析

定量 PCR 实验后，首先分别算出每个生物学感染实验中目的基因与内参在感染组与对照组中的 3 个 C_T 值的平均值，然后计算感染组、对照组中目的基因与内参 C_T 值的平均值的差；再以前者减去后者得到 $-\Delta\Delta C_T$ 值；最后计算 $2^{-\Delta\Delta C_T}$，所得的数值就是目的基因在感染组与对照组中的相对表达量。

2　结果与分析

2.1　白僵菌在家蚕幼虫上接种和感染

在适宜的温湿度下，附着在家蚕幼虫体壁上的

白僵菌分生孢子在 6 ~ 8 h 内萌发并穿透体壁，侵入昆虫体内。接种处理后约 36 h，3 龄幼虫体表出现了感染白僵菌的典型症状——油斑状病斑；感染幼虫在 60 h 内全部死亡，显微镜下观察濒死蚕的体液，发现其中有少量短菌丝；约 72 h 后死亡的幼虫体壁被白色菌丝覆盖。这说明处理蚕死于白僵菌感染；此时对照蚕处于正常的生长状态中，镜检体液无短菌丝。

2.2 数字基因表达谱文库

分别构建了接种 8 h 后感染组和对照组的数字基因表达谱文库。原始图像经转化后，感染组与对照组库中分别得到 3 969 200 和 4 819 322 个原始数据；去除其中的 3′接头、低质量及含杂质的成分后，分别得到 3 794 277 和 4 588 715 个 clean tag；其中，29% ~ 31% 的 clean tag、18% ~ 20% 的 Distinct clean tag 能够匹配到家蚕基因组数据库的基因中。最终，两个库中分别得到 5 444 和 5 348 个基因，其中，在两个库中均表达的基因有 4 034 个，占库中基因总量的 73.7%；仅在感染组中表达的有 760 个，占 13.9%；只在对照组中表达的有 678 个，占 12.4%。对两个库中的基因比对、汇总后得到 5 472个不同的基因(表 2，图 1)。

表 2 家蚕幼虫白僵菌感染组和对照组库中标签(tags)与基因(genes)的分布

Table 2 Distribution of tags and genes in the *Beauveria bassiana*-infected and uninfected (control) libraries of *Bombyx mori* larvae

标签与基因 Tags and genes	标签总数 Total number of tags		独特标签所占百分比 Percentage of distinct tags	
	感染组 Infected group	对照组 Control group	感染组 Infected group	对照组 Control group
原始数据 Raw data	3 969 200	4 819 322	4.58	4.20
洁净标签 Clean tags	3 794 277	4 588 715	1.88	1.64
与基因匹配的全部标签 All tags mapping to genes	1 197 135	1 338 847	20.26	18.87
与基因匹配的明确标签 Unambiguous tags mapping to genes	1 076 803	1 215 887	19.56	18.21
与标签匹配的全部基因 All tag-mapped genes	5 715	5 615		
与标签匹配的明确基因 Unambiguous tag-mapped genes	5 444	5 348		
与基因组匹配的标签 Tags mapping to genome	2 026 647	2 610 102	53.60	52.95
未知标签 Unknown tags	570 495	639 766	26.15	28.18

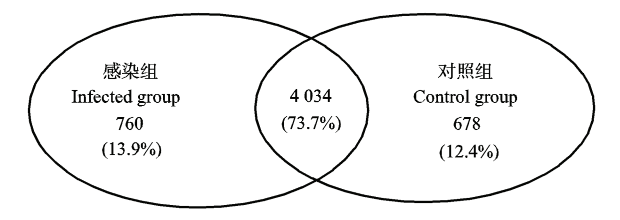


图 1 家蚕幼虫白僵菌感染库和对照库中基因数量与百分比的分布图

Fig. 1 Distribution of number and percentage of genes in the *Beauveria bassiana*-infected and uninfected (control) libraries of *Bombyx mori* larvae

2.3 GO 功能注释

根据 GO 分类中分子功能亚类分析本实验汇总后所获得的 5 472 个基因，发现有 885 个基因涉及了 90 种分子功能；由于一个基因可能具有多个功能域或活性，因此本研究以每个功能注释下的二级子目录进行统计分析。统计结果显示：排列在前三的分别是具有结合(binding)、水解酶活性(hydrolase activity)和结构分子活性(structural molecule activity)功能的基因(图 2)。

表 4　白僵菌感染 8 h 后家蚕体内参与 KEGG 通路的基因

Table 4　Genes involved in KEGG Pathways of *Bombyx mori* at 8 h post-inoculation of *Beauveria bassiana*

KEGG 通路 KEGG pathway	*Q* 值 *Q*-value	*P* 值 *P*-value	基因个数 Number of genes	
			上调 Up-regulation	下调 Down-regulation
核糖体 Ribosome	0.0000	0.0000	2	12
氨酰 tRNA 生物合成 Aminoacyl-tRNA biosynthesis	0.0001	0.0066	4	5
剪接体 Spliceosome	0.0003	0.0159	6	9
色氨酸代谢 Tryptophan metabolism	0.2278	0.0053	3	3
蛋白酶体 Proteasome	0.2420	0.0071	1	4
代谢途径 Metabolic pathways	0.4127	0.0174		
硫辛酸代谢 Lipoic acid metabolism	0.4127	0.0177	1	1
抗原处理及演示 Antigen processing and presentation	0.4127	0.0193	4	0
硒化合物的代谢 Selenocompound metabolism	0.5233	0.0291	1	1
阿米巴病 Amoebiasis	0.5233	0.0306	7	1
合计 Total			29	36

2.6　筛选到的免疫相关基因

病原侵染昆虫后，宿主通过模式识别受体识别病原相关分子模式从而激活昆虫的天然免疫，而胞外级联的蛋白酶参与调控免疫信号的扩大或缩小，再由具有信号转导功能的蛋白识别、转化免疫信号，激发宿主分泌免疫因子攻击外源物。在这过程中，涉及到一些免疫相关基因。本实验构建的文库中有一些表达水平发生变化的免疫相关基因（表 5），分别如下：

模式识别受体：本实验中检测到多个能编码具有识别或与模式识别受体功能的基因，如能编码 PGRP S6 precursor、β GRP 3 precursor、β GRP 4 precursor、C 类凝集素 11 前体（C-type lectin 11 precursor）、分子量为 50 kD 的凝集素（50 kD lectin）、溶血素（hemocytin）、含硫酯的蛋白 3（thioester-containing protein，TEP）、B 类清道夫受体（scavenger receptor class B）等蛋白的基因。

与信号调节有关的基因：本实验中检测到发卡结构域丝氨酸蛋白酶（clip domain serine proteases，CLIPs）、丝氨酸蛋白酶抑制剂 3 前体（Serpin 3 前体）、丝氨酸蛋白酶抑制剂 5 前体（Serpin 5 前体）、Serpin 13 前体、Serpin 14 前体、Serpin 21、Serpin 28 等与免疫信号调节有关的蛋白基因。

与信号转导有关的基因：本实验中检测到 Toll-like receptor 18-Wheeler、Toll 类似蛋白（Toll-like protein）、髓样细胞分化蛋白（myeloid differential primary response protein，MyD88）、Cactus、背侧蛋白 B 亚型（dorsal isoform B）等与信号转导相关的蛋白基因。

免疫因子基因：本实验检测到假定的溶菌酶（putative lysozyme）、溶菌酶前体（lysozyme precursor）、酚氧化酶激酶前体（prophenoloxidase activating enzyme precursor）、类免疫球蛋白（hemolin）、天蚕素 B 前体（cecropin B precursor）、抗菌肽（moricin I，lebocin 3 前体）等免疫因子基因。

表 5　感染白僵菌的家蚕数字基因表达谱文库中表达上调的部分免疫相关基因

Table 5　Up-regulated genes related with immunity in the DGE library of *Bombyx mori* infected with *Beauveria bassiana*

基因 Genes	感染组表达量 Expression level of the infected group	对照组表达量 Expression level of the control group	表达量比值(感染组/对照组) Ratio of expression level (infected/control)
肽聚糖识别蛋白 S6 前体基因 Peptidoglycan recognition protein S6 precursor gene	54.56	21.14	2.60
β-1, 3 葡聚糖识别蛋白 4 前体基因 β-1, 3-Glucan recognition protein 4 precursor gene	697.10	215.53	3.20
溶血素基因 Hemocytin gene	0.53	0.01	52.10
50 kD 凝血素基因 50 kD Lectin gene	145.75	36.18	4.00
B 类清道夫受体 3 基因 Scavenger receptor class B member 3 gene	1.05	0.65	1.60
丝氨酸蛋白酶抑制剂 3 前体基因 Serine protease inhibitor 3 precursor gene	19.77	2.40	8.00
丝氨酸蛋白酶抑制剂 21 基因 Serine protease inhibitor 21 gene	13.70	3.92	3.50
丝氨酸蛋白酶 13 基因 Serine protease 13 gene	3.16	0.65	4.90
丝氨酸蛋白酶前体基因 Serine protease precursor gene	5.80	2.62	2.10
Cactus 基因 Cactus gene	6.85	4.14	1.60
假定的 Toll 样受体基因 Putative Toll-like receptor gene	0.46	0.01	45.30
Toll 样受体 18-Wheeler 基因 Toll-like receptor 18-Wheeler gene	4.48	2.18	2.10
假定的溶菌酶基因 Putative lysozyme gene	45.59	14.38	3.20
溶菌酶前体基因 Lysozyme precursor gene	65.89	30.29	2.10
抗菌肽 I 基因 Moricin Ⅰ gene	9.22	2.18	4.30
天蚕素 B 前体基因 Cecropin-B precursor gene	48.23	33.78	1.40

2.7　荧光定量 PCR 结果分析

挑选了 10 个差异表达的基因，这些基因包括昆虫拟免疫相关基因和部分参与代谢、物质转运等生理过程的基因。根据其序列设计定量 PCR 引物进行荧光定量 PCR 分析(表 1)。结果表明：这 10 个基因的相对表达趋势与数字基因表达谱的实验结果一致，即除了 30kP protease A (43k peptide) precursor 基因表达下调外，其余基因表达均上调(图 5)；另外，编码 PGRP S6 precursor 的基因差异最显著(图 6)。

3 讨论

在家蚕的真菌病中，白僵菌是致病性强、病势急的一种病原。在适宜的温湿度下，附着在蚕体壁上的孢子可膨大、穿透体壁侵入宿主体内；随后利用宿主养分生长、繁殖，最终导致宿主死亡。在整个感染过程中，与孢子萌发及其在宿主体内生长繁殖的时间相比较，穿透宿主体壁所需要的时间较短，但其感染及宿主的抗性机制依然所知甚少。

本研究利用转录组测序技术研究家蚕被白僵菌侵染初期基因的差异表达，发现一些具有识别、结合、信号调节与转导、免疫因子功能的免疫相关基因表达上调。在具有识别功能的蛋白中，C-type lectin 11 是家蚕能特异识别真菌的蛋白；hemocytin 是家蚕特有的一种 C-type lectin 蛋白，目前仅在家蚕和果蝇等昆虫中发现。在免疫因子中，hemolin 和 moricin 是家蚕特有的免疫相关蛋白，目前在果蝇、按蚊等昆虫中尚未发现（Tanaka *et al.*, 2008）。与抑制性消减杂交与芯片等方法相比较，Solexa 测序方法快捷、精确，且获得的差异表达基因不仅数量多，且涉及面更广（Xiao *et al.*, 2010；Hou *et al.*, 2011；Wu *et al.*, 2011）。

本研究的 KEGG 通路分析表明，共有 38 个差异表达基因参与了 3 个显著性富集的途径，分别是核糖体、氨酰-tRNA 生物合成及剪接体通路。白僵菌孢子侵染家蚕后，其体内的菌丝既要“躲避”宿主免疫系统的识别，又要繁殖并随宿主体液流向全身，同时分泌能抑制或影响昆虫免疫与代谢功能、扰乱昆虫蜕皮和变态、甚至致死的毒素并产生草酸盐结晶，导致生物体代谢紊乱（Lewis *et al.*, 2009；Ruiz-Sanchez *et al.*, 2010；Ruiz-Sanchez and O′Donnell, 2012）；这些变化改变了家蚕对一些具有特定功能蛋白的需求。在免疫应激过程中，氨基酸被重新分配到与免疫应答有关的组织中，以合成免疫蛋白或对机体防御有重要作用的其他成分。因此，受刺激的免疫系统扰乱了机体的正常生理过程，也诱导了其对一些特殊氨基酸、蛋白质的需求（Le Floc'h *et al.*, 2004）。Huang 等（2009）以黑胸败血病菌感染家蚕的试验也证实部分基因编码的蛋白受到调控，本实验中抗原处理及演示通路（Trombetta and Mellman, 2005）、阿米巴病通路（Lejeune *et al.*, 2009）中基因表达量的变化与该说法一致。

核糖体通路中的核糖体蛋白与机体细胞的增值、分化、凋亡关系密切（Lindström and Nistér, 2010；Dutt *et al.*, 2011），致使其差异表达与机体的疾病与发育紧密相关，机体病变时核糖体蛋白也会低水平表达（Dai *et al.*, 2007）。氨酰-tRNA 生物合成通路中的氨酰-tRNA 连接酶既能专一性地识别氨基酸的侧链和 tRNA，也参与了转录、翻译调控、信号转导、凋亡及其他免疫应激等过程（贾捷和金由辛，2004）。凋亡也是昆虫抗感染的一种应激机制（Feng *et al.*, 2007）。剪接体通路中，剪接体的剪接加工使 mRNA 前体成为成熟、有功能的 mRNA，也是形成蛋白质多样化的关键机制之一（Maniatis and Tasic, 2002）。本研究的 3 个显著性富集的通路中相关基因表达的变化说明，白僵菌侵染家蚕后，宿主可能启动了凋亡途径，合成具有免疫功能的蛋白来抵御其体内的菌丝；另外，感染后宿主的食量相对减少、生长变缓，导致机体需要合成的蛋白质也相对减少，致使一些相关基因的表达水平下调。

定量 PCR 分析表明，输入蛋白 7（importin 7, Imp-7）、假定的溶菌酶（putative lysozyme）、30kP 蛋白酶 A 前体（30 kP protease A precursor）基因的表达趋势与数字表达谱结果一致。Imp-7 属于 β 输入蛋白家族，其表达水平的变化是细胞分化的一个关键调控器（Ao *et al.*, 2007；Zaitseva *et al.*, 2009）。溶菌酶能水解、切开病原肽聚糖的 β-1, 4-糖苷键，这些被切开的片段由于能被昆虫的肽聚糖识别蛋白识别从而起到信号分子的作用，并启动昆虫的天然免疫应答（Park *et al.*, 2007）；溶菌酶还可调节外源物的黑化（Li and Paskewitz, 2006），以细菌为食物来源并清除其他抗菌蛋白作用于细菌时产生的碎片（Erban and Hubert, 2008）。30kP 蛋白酶 A 是类胰肽酶丝氨酸蛋白酶之一，其选择性水解的 30 kD 蛋白参与了酚氧化酶原的激活并能抑制蚕体内菌丝的生长（Ujita *et al.*, 2005）。孢子入侵及菌丝在蚕体内流动、繁殖刺激了家蚕的免疫系统、导致了这 3 种具有免疫或运输功能的特殊蛋白的合成增加，溶菌酶表达量的增加可能启动了家蚕的天然免疫、黑化或消化位于宿主体内的菌丝；30kP 蛋白酶 A 前体可能促进了 30kP 蛋白酶 A 的转化，最终促使循环系统中 30kD 蛋白的水解以抑制菌丝生长，而 Imp-7 可能促进了相关蛋白的转运。

肽聚糖识别蛋白（peptidoglycan recognition proteins, PGRPs）是生物体内非常保守、能识别病原相关分子模式的一类模式识别受体；本实验中

PGRP-S6 是一种低分子量的短链胞外蛋白。PGRPs 能启动昆虫免疫系统中酚氧化酶原的激活，并将有毒的黑色素转移到入侵的微生物中(Park *et al.*，2006)。该受体通常作用于 Toll 和 IMD 途径的上游以识别、连接病原体壁的肽聚糖(Tanji and Ip，2005)。DGE 与定量 PCR 方法均检测到该基因的表达上调，表明 PGRP-S6 识别并连接到真菌的肽聚糖上，启动了宿主的天然免疫。

白僵菌感染家蚕后，家蚕的一些相关基因的表达发生变化；其他病原感染家蚕后，也有相似的变化出现。Zhou 等(2013)用基因芯片分析家蚕抗、易感 NPV 品种感染 BmNPV 时发现，在感染 0～48 h 内丝氨酸蛋白酶前体基因的表达量在所有家蚕品种中几乎没变化；而在感染 0～72 h 内，感性品种中的表达量显著高于抗性品种。而 Qin 等(2012)等用相同的试验材料得出：丝氨酸蛋白酶(丝氨酸蛋白酶前体的转化产物)基因在抗性品种中显著表达，而在感性品种中却不表达。目前依然无法解释丝氨酸蛋白酶基因的表达是受调控还是受微生物成分的诱导。尽管 Sagisaka 等(2010)等发现家蚕感染 BmNPV 12 h 后，热激蛋白基因的表达显著降低；Bao 等(2009)用抑制性消减杂交技术、Wu 等(2011)等用芯片技术却发现家蚕感染 BmDNV 及 BmCPV 后，热激蛋白基因表达上调；本实验中也检测到热激蛋白(Hsp1，Hsp21.4，Hsp25.4 和 Hsp60 等)基因的表达上调。这些说明不同类型的外源物在不同的家蚕品种间会导致应答反应的差异。

本研究设计了 10 个差异表达基因的荧光定量 PCR 引物进行定量 PCR 实验以验证数字表达谱的准确性；结果发现其表达趋势一致(图 5)。由于用不同的研究方法得到的基因表达结果可能不一致(Luo *et al.*，2005)，所以用数字表达谱获得的差异基因表达状况需要用定量 PCR 验证。

本研究用高通量的 Solexa 测序技术对感染白僵菌的家蚕幼虫进行转录组测序和功能分析，最终获得 5 472 个基因，其中有 377 个差异表达基因，12 个上调基因、26 个下调基因参与 3 个显著性富集的 KEGG Pathway。但关于这些基因的差异表达及其参与的 Pathway 在家蚕抵御白僵菌感染过程的功能与作用，需要今后进一步深入开展研究。家蚕感染白僵菌的转录组研究，对家蚕与白僵菌的互作、家蚕各种途径相关的关键基因的发掘为基因克隆、功能研究提供了数据基础，为家蚕抵御真菌侵染的研究、白僵菌应用于农林害虫的生物防治新策略的研发提供了丰富的基因信息及新的研究方向。

参考文献(References)

Ao Z, Huang G, Yao H, Xu ZK, Labine M, Cochrane AW, Yao XJ, 2007. Interaction of human immunodeficiency virus type 1 integrase with cellular nuclear import receptor importin 7 and its impact on viral replication. *J. Biol. Chem.*, 282(18): 13456–13467.

Bao YY, Tang XD, Lv ZY, Wang XY, Tian CH, Xu YP, Zhang CX, 2009. Gene expression profiling of resistant and susceptible *Bombyx mori* strains reveals nucleopolyhedrovirus-associated variations in host gene transcript levels. *Genomics*, 94(2): 138–145.

Dai MS, Arnold H, Sun XX, Sears R, Lu H, 2007. Inhibition of c-Myc activity by ribosomal protein L11. *EMBO J.*, 26(14): 3332–3345.

Dutt S, Narla A, Lin K, Mullally A, Abayasekara N, Megerdichian C, Wilson FH, Currie T, Gupta AK, Berliner N, Kutok JL, Ebert BL, 2011. Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells. *Blood*, 117(9): 2567–2576.

Erban T, Hubert J, 2008. Digestive function of lysozyme in synanthropic acaridid mites enables utilization of bacteria as a food source. *Exp. Appl. Acarol.*, 44(3): 199–212.

Feng G, Yu Q, Hu CY, Wang YJ, Yuan GM, Chen QJ, Yang K, Pang Y, 2007. Apoptosis is induced in the haemolymph and fat body of *Spodoptera exigua* larvae upon oral inoculation with *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus. *J. Gen. Virol.*, 88(8): 2185–2193.

Hou CX, Qin GX, Liu T, Mei XL, Zhang R, Zhao P, Shen ZY, Guo XJ, 2011. Differential gene expression in silkworm in response to *Beauveria bassiana* infection. *Gene*, 484(1–2): 35–41.

Huang LL, Cheng TC, Xu PZ, Cheng DJ, Fang T, Xia QY, 2009. A genome-wide survey for host response of silkworm, *Bombyx mori* during pathogen *Bacillus bombyseptieus* infection. *PLoS ONE*, 4(12): e8098

Jia J, Jin YX, 2004. Macromolecular network and new function of aminoacyl-tRNA synthetases. *Prog. Biochem. Biophys.*, 31(4): 291–295. [贾捷，金由辛，2004. 氨酰 tRNA 合成酶的分子网络和功能. 生物化学与生物物理进展，31(4): 291–295]

Le Floc'h N, Melchior D, Obled C, 2004. Modifications of protein and amino acid metabolism during inflammation and immune system activation. *Livest. Prod. Sci.*, 87(1): 37–45.

Lejeune M, Rybicka JM, Chadee K, 2009. Recent discoveries in the pathogenesis and immune response toward *Entamoeba histolytica*. *Future Microbiol.*, 4(1): 105–118.

Lewis MW, Robalino IV, Keyhani NO, 2009. Uptake of the fluorescent probe FM4-64 by hyphae and haemolymph-derived *in vivo* hyphal bodies of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Microbiology*, 155(9): 3110–3120.

Li B, Paskewitz SM, 2006. A role for lysozyme in melanization of Sephadex beads in *Anopheles gambiae*. *J. Insect Physiol.*, 52(9): 936–942.

Lindström MS, Nistér M, 2010. Silencing of ribosomal protein S9 elicits a multitude of cellular responses inhibiting the growth of cancer cells subsequent to p53 activation. *PLoS ONE*, 5(3): e9578.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods*, 25: 402–408.

Lu DD, Pava-Ripoll M, Li ZZ, Wang CS, 2008. Insecticidal evaluation of *Beauveria bassiana* engineered to express a scorpion neurotoxin and a cuticle degrading protease. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 81: 515–522.

Luo M, Liang XQ, Dang P, Holbrook CC, Bausher MG, Lee RD, Guo BZ, 2005. Microarray-based screening of differentially expressed genes in peanut in response to *Aspergillus parasiticus* infection and drought stress. *Plant Sci.*, 169(4): 695–703.

Maniatis T, Tasic B, 2002. Alternative pre-mRNA splicing and proteome expansion in metazoans. *Nature*, 418(6894): 236–243.

Park JW, Je BR, Piao S, Inamura S, Fujimoto Y, Fukase K, Kusumoto S, Söderhäll K, HaNC, Lee BL, 2006. A synthetic peptidoglycan fragment as a competitive inhibitor of the melanization cascade. *J. Biol. Chem.*, 281(12): 7747–7755.

Park JW, Kim CH, Kim JH, Je BR, Roh KB, Kim SJ, Lee HH, Ryu JH, Lim JH, Oh BH, Lee WJ, Ha NC, Lee BL, 2007. Clustering of peptidoglycan recognition protein-SA is required for sensing lysine-type peptidoglycan in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(16): 6602–6607.

Qin LG, Xia HC, Shi HF, Zhou YJ, Chen L, Yao Q, Liu XY, Feng F, Yuan Y, Chen KP, 2012. Comparative proteomic analysis reveals that caspase-1 and serine protease may be involved in silkworm resistance to *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus. *J. Proteomics*, 75(12): 3630–3638.

Ruiz-Sanchez E, O′Donnell MJ, 2012. Effects of the microbial metabolite destruxin A on ion transport by the gut and renal epithelia of *Drosophila melanogaster*. *Arch. Insect Biochem.*, 80(2): 109–122.

Ruiz-Sanchez E, Orchard I, Lange AB, 2010. Effects of the cyclopeptide mycotoxin destruxin A on the Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus* (Stål). *Toxicon*, 55(6): 1162–1170.

Sagisaka A, Fujita K, Nakamura Y, Ishibashi J, Noda H, Imanishi S, Mita K, Yamakawa M, Tanaka H, 2010. Genome-wide analysis of host gene expression in the silkworm cells infected with *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *Virus Res.*, 147(2): 166–175.

Tanaka H, Ishibashi J, Fujita K, Nakajima Y, Sagisaka A, Tomimoto K, Suzuki N, Yoshiyama M, Kaneko Y, Iwasaki T, Sunagawa T, Yamaji K, Asaoka A, Mita K, Yamakawa M, 2008. A genome-wide analysis of genes and gene families involved in innate immunity of *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 38(12): 1087–1110.

Tanji T, Ip YT, 2005. Regulators of the Toll and Imd pathways in the *Drosophila* innate immune response. *Trends Immunol.*, 26(4): 193–198.

Tao SX, Li Y, Liu JF, Zhu SR, 2011. Effect of the fungal pathogen, *Beauveria bassiana* on number and encapsulation of hemocytes in *Ostrinia furnacalis* larvae. *Acta Phytophylacica Sinica*, 38(6): 527–531. [陶淑霞, 李玉, 刘家富, 朱殊蕊, 2011. 球孢白僵菌对亚洲玉米螟幼虫血细胞数量和包囊作用的影响. 植物保护学报, 38(6): 527–531]

Trombetta ES, Mellman I, 2005. Cell biology of antigen processing *in vitro* and *in vivo*. *Annu. Rev. Immnol.*, 23: 975–1028.

Ujita M, Katsuno Y, Kawachi I, Ueno Y, Banno Y, Fujii H, Hara A, 2005. Glucan-binding activity of silkworm 30-kDa apolipoprotein and its involvement in defense against fungal infection. *Biosc. Biotechnol. Biochem.*, 69(6): 1178–1185.

Wang D, Su YY, Huang DZ, Ji HF, Ma FX, Li ZB, 2009. Defense response of hemolymph in the *Apriona germari* larvae to *Beauveria bassiana*. *Scientia Silvae Sinicae*, (4): 83–87. [王达, 苏筱雨, 黄大庄, 纪慧芳, 马凤新, 李振波, 2009. 桑天牛幼虫血淋巴对球孢白僵菌的防御反应. 林业科学, (4): 83–87]

Wu P, Wang X, Qin GX, Liu T, Jiang YF, Li MW, Guo XJ, 2011. Microarray analysis of the gene expression profile in the midgut of silkworm infected with cytoplasmic polyhedrosis virus. *Mol. Biol. Rep.*, 38(1): 333–341.

Xiao SQ, Jia JY, Mo DL, Wang QW, Qin LM, He ZY, Zhao X, Huang YK, Li AN, Yu JW, Niu YN, Liu XH, Chen YS, 2010. Understanding PRRSV infection in porcine lung based on genome-wide transcriptome response identified by deep sequencing. *PLoS ONE*, 5(6): e11377.

Zaitseva L, Cherepanov P, Cherepanov P, Leyens L, Wilson SJ, Rasaiyaah J, Fassati A, 2009. HIV-1 exploits importin 7 to maximize nuclear import of its DNA genome. *Retrovirology*, 6(1): 11.

Zhou Y, Gao L, Shi HF, Xia HC, Gao L, Lian CQ, Chen L, Yao Q, Chen KP, Liu XY, 2013. Microarray analysis of gene expression profile in resistant and susceptible *Bombyx mori* strains reveals resistance-related genes to nucleopolyhedrovirus. *Genomics*, 101: 256–262.

（责任编辑：赵利辉）